

На правах рукописи

Нурланбаева Алия Ергалиевна

**КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
МАРКЕРОВ ФИБРОЗИРОВАНИЯ
ФИЛЬТРАЦИОННЫХ ПОДУШЕК
ПРИ РЕФРАКТЕРНОМ ТЕЧЕНИИ
ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

14.01.07 – глазные болезни

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор биологических наук,
профессор

Айдагулова Светлана Владимировна

доктор медицинских наук

Гусаревич Ольга Геннадьевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Потапова Оксана Валентиновна

(Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины, руководитель лаборатории структурных основ патогенеза социально значимых заболеваний, г. Новосибирск)

доктор медицинских наук, профессор

Черных Валерий Вячеславович

(Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С. Н. Федорова, Новосибирский филиал, директор, г. Новосибирск)

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « _____ » _____ 2015 г. в ____ ч на заседании диссертационного совета Д 208.062.05 на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52; 8 (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52; <http://ngmu.ru/dissertation/360>)

Автореферат разослан « _____ » _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

А. В. Волков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Шлеммов канал, коллекторные каналы и водяные вены являются структурными элементами лимфодренажной системы глаза и, наряду с соединительнотканными компонентами трабекулярной сети, играют важную роль в механизмах поддержания нормального офтальмотонуса (Быков В. Л., 2003; Нестеров А. П., 2008; Renata R. et al., 2007; Watanabe Y. et al., 2010; Stamer W. D. et al., 2015). Значение лимфодренажа и дисфункция лимфоидных элементов продемонстрированы при различных процессах, связанных с изменением клеточной биологии и структурно-функциональных свойств внеклеточного матрикса (Бородин Ю. И., 2009). Кроме того, в последние годы все большее значение придают развитию клеточных технологий, призванных решать задачи конструирования биологических эквивалентов различных тканей и органов (Малюгин Б. Э и др., 2014; Friedlander M., 2012).

Трабекулярная сеть и шлеммов канал обеспечивают основную фильтрацию внутриглазной жидкости (ВГЖ) и несут главную ответственность за возрастание резистентности оттоку и повышение внутриглазного давления (ВГД), ассоциированных с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ). Глаукома – хроническая прогрессирующая оптическая нейропатия с дефектами полей зрения – занимает одно из первых мест среди причин необратимой слепоты во всем мире (Егоров Е. А., 2014; Bettin P., Di Matteo F., 2013). Ведущим фактором риска в развитии ПОУГ является повышенное ВГД, генерируемое в системе циркуляции ВГЖ в переднем сегменте глаза. ВГЖ секретируется непигментированным цилиарным эпителием и течет в угол передней камеры глаза, откуда фильтруется трабекулярной сетью в шлеммов канал (Tamm E. R., 2009; Swaminathan S. S. et al., 2014). При ПОУГ увеличено сопротивление прохождению ВГЖ в трабекулярной сети, особенно в юкстаканаликулярной соединительной ткани, что и приводит к повышению ВГД (Вит В. В., 2003; Золотарев А. В. и др., 2013; Renata R. et al., 2007; Kokotas H. et al., 2012). В возрастании резистентности трабекулярной сети к оттоку ВГЖ при ПОУГ важную роль играют изменения экстрацеллюлярного матрикса (Wallace D. M. et al., 2014).

Для лечения глаукомы, основной целью которого является снижение

уровня ВГД, применяют местную антигипертензивную терапию и оперативное лечение с созданием искусственных путей оттока ВГЖ. Долгосрочный успех операции зависит от пред- и интраоперационных условий, но в первую очередь определяется эффективностью фильтрации вновь созданных путей оттока ВГЖ (Шмырева В. Ф. и др., 2010). Поэтому в клинической практике послеоперационное наблюдение за развивающейся фильтрационной подушкой является важным инструментом в достижении целевого ВГД у пациентов с антиглаукомными операциями (Weizer J. S. et al., 2010; Furrer S. et al., 2012).

Высокая активность матрикс-продуцирующих клеток лежит в основе прогрессирования глаукомы (Лебедев О. И., 1993; Юрьева Т. Н. и др., 2007; Алексеев В. Н., 2012; Егоров Е. А., 2014; Golez E., Latina M., 2012; Salim S., Dorairaj S., 2013). Для прогнозирования эффективности антиглаукомных операций применяют метод ультразвуковой визуализации путей оттока ВГЖ – ультразвуковую биомикроскопию (УБМ) (Волкова Н. В. и др., 2013; Щуко А. Г. и др., 2013; Chen L. et al., 2013).

Рефрактерное течение ПОУГ характеризуется ускоренным рубцеванием зоны оперативного вмешательства и сокращением периода компенсации уровня ВГД, что требует проведения повторных хирургических вмешательств для предотвращения прогрессирования глаукомного процесса (Астахов Ю. С., 2006; Бессмертный А. М., 2006). Неудовлетворительные результаты оперативного лечения пациентов с рефрактерным течением ПОУГ индуцируют изучение клеточных и молекулярных механизмов ускоренного рубцевания фильтрационных подушек (Wallace D. M. et al., 2014).

В межоперационном периоде пациентам назначают местную моно- или комбинированную гипотензивную терапию, состоящую преимущественно из аналогов простагландинов, антагонистов β -адренорецепторов (β -блокаторов) и ингибиторов карбоангидразы, а также их сочетаний (Еричев В. П. и др., 2010; Куроедов А. В., Огородникова В. Ю., 2010; Ходжаев Н. С. и др., 2013; Schwartz G. F. et al., 2013), однако проблема выбора медикаментозной терапии для пациентов с рефрактерным течением ПОУГ и ее влияние на характер рубцевания фильтрационных подушек остаются недостаточно изученными (Kerr N. M. et al., 2013).

Цель исследования. По данным гистологического изучения соединительнотканых элементов склеральных лоскутов и на основе визуализации с помощью ультразвуковой биомикроскопии провести анализ фиброобразования фильтрационных подушек при рефрактерном течении первичной открытоугольной глаукомы в условиях применения местных гипотензивных препаратов различных групп.

Задачи исследования

1. На основе светооптического и электронно-микроскопического исследования склеральных лоскутов, полученных в ходе глубокой склерэктомии, изучить ультраструктурные особенности эндотелиоцитов лимфатических сосудов глаза при рефрактерном течении первичной открытоугольной глаукомы и у впервые оперированных пациентов.

2. С помощью световой и электронной микроскопии исследовать матрикс-продуцирующие клетки и волокна соединительной ткани склеры при рефрактерном течении первичной открытоугольной глаукомы и у впервые оперированных пациентов.

3. По результатам двухшагового стрептавидин-биотинового иммуногистохимического исследования парафиновых срезов склеральных лоскутов оценить экспрессию биомаркера CD34 в эндотелиоцитах сосудов склеры при первичной открытоугольной глаукоме.

4. По результатам применения автоматизированной системы анализа изображений оценить уровень экспрессии фибронектина в экстрацеллюлярном матриксе склеры при первичной открытоугольной глаукоме.

5. Изучить фильтрационные подушки с помощью ультразвуковой биомикроскопии, визуализирующей искусственно созданные пути оттока внутриглазной жидкости, при рефрактерном течении первичной открытоугольной глаукомы в условиях применения местных гипотензивных препаратов различных групп.

6. Провести ретроспективный статистический анализ эффективности местной медикаментозной терапии у пациентов с рефрактерным течением первичной открытоугольной глаукомы и перед первичной антиглаукомной операцией.

Научная новизна. С помощью двухшагового стрептавидин-биотинового иммуногистохимического исследования парафиновых срезов изучена экспрессия биомаркеров CD34 и фибронектина и структурные изменения в зоне антиглаукомного оперативного вмешательства при декомпенсированном ВГД у пациентов с рефрактерным течением ПОУГ.

У впервые оперированных пациентов экспрессия CD34 имела место в эндотелиальных клетках и перицитах коллекторных канальцев дренажной системы глаза, сочетаясь с расширением их просветов. Экспрессия фибронектина имела экстрацеллюлярный характер, приурочена к водяным венам и повышена при увеличении числа фибробластов. Наиболее выраженная экспрессия CD34 и фибронектина отмечена у пациентов без медикаментозного лечения, менее значимая – при монотерапии аналогами простагландинов.

При рефрактерном течении ПОУГ относительно большее количество CD34-позитивных клеток выявлено при применении β -блокаторов в сочетании с ингибиторами карбоангидразы, что прямо коррелировало с визуализируемыми с помощью УБМ разлитыми фильтрационными подушками. Экспрессия фибронектина более значительна в образцах склеры пациентов при монотерапии аналогами простагландинов или β -блокаторами, наименьшая – при применении β -блокаторов с ингибиторами карбоангидразы или с аналогами простагландинов.

На основе УБМ-анализа зоны антиглаукомного оперативного вмешательства с акцентом на применении нескольких вариантов местной гипотензивной терапии показано недостижение целевых значений ВГД у пациентов с рефрактерным течением ПОУГ по сравнению с ПОУГ с компенсируемым ВГД, что сопровождалось достоверно ($p \leq 0,01$) низкими УБМ-показателями высоты фильтрационной подушки и интрасклеральной полости.

Ретроспективный статистический анализ 1 197 глаз пациентов с ПОУГ, в том числе с рефрактерным течением, не выявил достоверного влияния местной гипотензивной терапии на достижение целевого ВГД при рассмотрении без учета и с учетом стадии глаукомы.

Практическая значимость. Клинико-морфологический анализ фиброобразования фильтрационных подушек у пациентов с рефрактерным течением ПОУГ, применяющих для снижения уровня ВГД местные

гипотензивные препараты различных групп, продемонстрировал особенности структурных изменений в склере, в том числе пролиферативные реакции эндотелиоцитов лимфатических капилляров (коллекторных канальцев). С теоретической точки зрения, при ПОУГ обнаружена экспрессия CD34 (маркера кровеносных сосудов) элементами лимфатической системы глаза.

Предпринят поиск новых маркеров фиброобразования фильтрационных подушек в результате антиглаукомных операций, в том числе у пациентов с рефрактерным течением ПОУГ, что имеет значение для поиска новых антиглаукомных средств и методов. По данным визуализации с помощью УБМ и на основе изучения экспрессии молекулярно-биологических маркеров в склеральных лоскутах, показана позитивная роль комплексных гипотензивных препаратов без участия аналогов простагландинов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В соединительной ткани склеры при ПОУГ наибольший уровень экспрессии биомаркеров CD34 и фибронектина имеет место при отсутствии местного гипотензивного лечения, несколько меньший – при монотерапии аналогами простагландинов; при применении других гипотензивных схем лечения экспрессия снижена или отсутствует.

2. При рефрактерном течении ПОУГ наибольшее количество CD34-позитивных эндотелиальных клеток выявлено при применении β -блокаторов в сочетании с ингибиторами карбоангидразы, что прямо коррелировало с визуализируемыми с помощью УБМ разлитыми фильтрационными подушками. Экспрессия фибронектина в экстрацеллюлярном матриксе соединительной ткани склеры более значительна при предоперационной монотерапии аналогами простагландинов или β -блокаторами.

3. При рефрактерном течении ПОУГ, по сравнению с наблюдениями с компенсируемым ВГД, в условиях нескольких вариантов местной гипотензивной терапии при ультразвуковой биомикроскопии зоны оперативного вмешательства выявлены достоверно низкие показатели высоты фильтрационной подушки и интрасклеральной полости ($p \leq 0,01$).

Апробация работы. Результаты исследования представлены на 5-й Российской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Авиценна-2014» (Новосибирск, 2014); на телеконференции «Актуальные

вопросы офтальмологии» между городами Москва, Новосибирск, Саратов и Тюмень (Саратов, 2014); на научно-практической конференции, посвященной 20-летию курса офтальмологии ФПК и ППС СибГМУ «Современные технологии диагностики и лечения заболеваний органа зрения» (Томск, 2014) и на расширенном заседании проблемных комиссий «Морфологические основы компенсаторно-приспособительных реакций» и «Патология сенсорных систем организма» с участием сотрудников кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии и кафедры офтальмологии Новосибирского государственного медицинского университета (Новосибирск, 2014).

Внедрение. Результаты исследования склеральных лоскутов при ПОУГ внедрены в курс практических занятий по частной гистологии по теме «Соединительная ткань глаза» на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии Новосибирского государственного медицинского университета и в курс лекций и практических занятий кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии в раздел «Соединительная ткань» АО «Медицинский Университет Астана». Данные по лечению рефрактерной глаукомы внедрены в учебный процесс отдела постдипломного образования Казахского ордена «Знак Почета» НИИ глазных болезней (г. Алматы) по циклу «Глаукома» и курс лекций на кафедре офтальмологии Новосибирского государственного медицинского университета.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 4 статьи в журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов для публикаций материалов диссертации.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и практических рекомендаций. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 9 таблиц и 54 рисунков. Указатель литературы представлен 243 источниками, из которых 157 – зарубежных авторов.

Личный вклад автора. Автор принимал участие в оперативном лечении и заборе материала у пациентов с глаукомой в качестве ассистента. Лично проанализированы 650 историй болезни пациентов с ПОУГ, собран клинический материал, произведена его статистическая обработка и анализ

полученных результатов. Лично проведены гистологические исследования. Опубликованные работы написаны автором или при непосредственном его участии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено *комплексное гистологическое исследование* склеральных лоскутов 112 пациентов (78 мужчин и 34 женщин) с ПОУГ в возрасте от 53 до 82 лет ($68,6 \pm 1,6$ лет), которым впервые и повторно выполнены антиглаукомные операции. Критерии включения в исследование: диагноз ПОУГ I–IV стадии с декомпенсированным ВГД ($28,86 \pm 1,54$) мм рт. ст. Среди критериев исключения были противопоказания к применению местных гипотензивных препаратов. Исследование одобрено комитетом по этике Новосибирского государственного медицинского университета.

Пациенты разделены на 3 группы сопоставимого возраста в зависимости от количества антиглаукомных операций и применения местной гипотензивной терапии. В 1-й группе (10 наблюдений) в силу различных причин пациенты не применяли до оперативного лечения местные гипотензивные средства. Пациенты 2-й группы (64 случая) для снижения ВГД до проведения первой операции использовали 7 различных комбинаций антиглаукомных препаратов: в качестве монотерапии 11 человек применяли аналоги простагландинов, 6 – β -блокаторы, 6 – ингибиторы карбоангидразы; в качестве комбинированной терапии по 14 пациентов использовали сочетание β -блокаторов с аналогами простагландинов или с ингибиторами карбоангидразы, 5 – аналоги простагландинов с ингибиторами карбоангидразы, и остальные 8 пациентов применяли аналоги простагландинов, β -блокаторы и ингибиторы карбоангидразы одновременно.

В 3-ю группу вошли 38 пациентов с рефрактерным течением ПОУГ, которым, в отличие от первых двух групп, выполнены две и более антиглаукомные операции (последняя – глубокая склерэктомия); с торпидным декомпенсированным ВГД ($31,72 \pm 0,69$) мм рт. ст. несмотря на применение указанных для 2-й группы препаратов (соответственно по 5, 2, 5, 7, 7, 5 и 7 глаз пациентов).

Светооптическое и иммуногистохимическое исследование склеральных лоскутов. Иссекаемые в ходе антиглаукомной операции образцы склеры фиксировали в 4 %-м растворе параформальдегида, приготовленном на фосфатном буфере Миллонига (рН 7,2 – 7,4). Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Саркисов Д. С., Перов Ю. Л., 1996). Для иммуногистохимического анализа в качестве первичных антител использовали мышинные анти-CD34 (Clone ICO115) и мышинные анти-Fibronectin (Clone IST-9) производства Santa Cruz (США) в разведении 1 : 50 с негативными контролями (Петров С. В., Райхлин Н. Т., 2000). Для визуализации продуктов реакции использовали SuperPicture 3rd IHC Detection Kit с диаминобензидином. Площадь экспрессии фибронектина выражали в квадратных пикселях и оценивали с помощью микроскопа Axio Scope.A1 с фотокамерой AxioCam MRc5 и программным обеспечением ZEN blue (С. Zeiss), для каждого параметра оценивали по 10–20 изображений суммарной площадью 625 мм².

Для электронно-микроскопического исследования образцы дофиксировали в 1 % растворе OsO₄ и заливали в смесь эпона и арамидита. Полутонкие срезы (1 мкм) окрашивали толуидиновым синим. Ультратонкие срезы (300–500 нм) контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца в парах щелочи натрия и исследовали в электронных микроскопах JEM 100-S и JEM 1400.

Ультразвуковая биомикроскопия переднего отрезка глаза и искусственно созданных путей оттока ВГЖ проведена 104 оперированным пациентам (74 мужчины и 30 женщин, 108 глаз) в возрасте от 53 до 82 лет ($68,6 \pm 0,8$ лет) с полным офтальмологическим обследованием. Изучали параметры, прямо или косвенно характеризующие отток ВГЖ: высоту интрасклеральной полости и фильтрационной подушки, толщину конъюнктивального и склерального лоскутов в соответствии с классификацией А. Г. Шуко и соавт. (2013).

Ретроспективный статистический анализ эффективности 8 схем местной медикаментозной терапии (таблица) выполнен с учетом стадии ПОУГ и уровня ВГД: изучено 650 историй болезни пациентов с ПОУГ ($67,9 \pm 1,3$ лет) (404 мужчин и 246 женщин, 1197 глаз), госпитализированных в офтальмологическое отделение Государственной Новосибирской областной клинической больницы в период 2011–2014 гг.

Таблица – Характеристика ПОУГ и схем местной гипотензивной терапии

Схе- -мы	Препараты	Стадии ПОУГ, количество глаз, абс. (%)			
		начальная, n = 274	развитая, n = 454	далекоза- шедшая, n = 316	термина- льная, n = 153
1	Аналоги простагландинов, n = 164	54 (20 %)	57 (12,5 %)	40 (13 %)	13 (8,5 %)
2	β-блокаторы, n = 178	41 (15 %)	64 (14 %)	39 (12 %)	34 (22 %)
3	Ингибиторы карбоангидразы, n = 56	10 (3 %)	24 (6 %)	14 (4 %)	8 (5 %)
4	Аналоги простагландинов + β-блокаторы, n = 194	44 (16 %)	85 (19 %)	52 (16,5 %)	13 (8,5 %)
5	β-блокаторы + ингибиторы карбоангидразы, n = 325	63 (23 %)	119 (26 %)	97 (31 %)	46 (30 %)
6	Аналоги простагландинов + ингибиторы карбоангидразы, n = 90	19 (7 %)	37 (8 %)	22 (7 %)	12 (8 %)
7	Аналоги простагландинов + β-блокаторы + ингибиторы карбоангидразы, n = 40	8 (3 %)	15 (3 %)	11 (3,5 %)	6 (4 %)
8	α-2-адреномиметик + β-блокаторы, n = 45	13 (5 %)	16 (3,5 %)	13 (4 %)	3 (2 %)
0	Без препаратов, n = 105	22 (8 %)	37 (8,0 %)	28 (9 %)	18 (12 %)

Статистическая обработка результатов исследования. В сравниваемых группах для оценки достоверности различий при нормальном распределении изучаемых признаков применяли критерий Стьюдента, различия считали достоверными при $p \leq 0,05$. Методы описательной статистики использованы для характеристики групп пациентов по полу, возрасту, состоянию хрусталика и продолжительности лечения. Для работы с категориальными данными использован критерий хи-квадрат; для сравнения эффективности моно- и комбинированной местной гипотензивной терапии в зависимости от стадии глаукомы – мультифакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Попарное сравнение с регулируемым множественным сравнением проведено с помощью Tukey-теста. Программное обеспечение – пакет анализа SPSS Statistics 17.0 и Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексное морфологическое исследование склеры. Резецированные в ходе антиглаукомной операции треугольные склеральные лоскуты содержали в основании элементы юстаканаликулярной ткани, переходящие в

компаратмент коллекторных канальцев и водяных вен, локализующихся в плотной фиброзной ткани с варьирующим содержанием матрикс-продуцирующих клеток.

У впервые оперированных пациентов с ПОУГ с декомпенсированным ВГД, независимо от стадии глаукомы и возраста, элементы трабекулярной сети содержали зерна меланина. Почти в половине наблюдений юкстаканаликулярная ткань имела компактное, плотное строение с уплощенными или дегенерирующими трабекулярными клетками и резко редуцированными свободными пространствами. В другой половине наблюдений юкстаканаликулярная ткань отечна, с крупными фибробластами и эндотелиоцитами.

Коллекторные канальцы с узкими просветами, выстланы уплощенным эндотелием. Водяные вены с широкими просветами, высоким эндотелием и периваскулярной клеточной инфильтрацией, в составе которой доминировали матрикс-продуцирующие клетки. Следует отметить, что какие-либо закономерности в структурной организации соединительной ткани в зависимости от применяемой до антиглаукомной операции схемы медикаментозной моно- или комбинированной терапии не выявлены.

У повторно оперированных пациентов склеральные лоскуты иссекали перифокально предыдущей склерэктомии и реже – на большем удалении от зоны первичного хирургического вмешательства. Образцы склеры отличались сравнительно более выраженной, но неравномерной пролиферативной реакцией фибробластов вокруг водяных вен и вдоль краев резекции. Коллекторные канальцы и водяные вены имели полиморфное строение, в том числе различную ширину просветов и степень цитодеструкции эндотелиальной выстилки. Волокна и основное вещество соединительной ткани иногда имели низкую плотность, способствующую оттоку ВГЖ, что по данным УБМ сочеталось с более высокой фильтрационной подушкой. У пациентов с рефрактерным течением ПОУГ подушка была плоской с щелевидной или редуцированной интрасклеральной полостью; в склере – плотные массы коллагеновых фибрилл.

Результаты ультразвуковой биомикроскопии вновь созданных путей оттока ВГЖ. Высота интрасклеральной полости у пациентов с

компенсированным и декомпенсированным ВГД была меньше, чем в контрольной группе, за исключением пациентов 1-й группы, получающих комбинированную терапию β -блокаторами с ингибиторами карбоангидразы: у них данный показатель был в 2 раза выше, хотя и не достигал значения контрольной группы.

В соответствии с классификацией А. Г. Щуко и соавт. (2013), в подгруппах с декомпенсированным ВГД при монотерапии, высота интрасклеральной полости оценивалась в 1 балл, что являлось обоснованием повторного хирургического вмешательства. Соответствие интрасклеральной полости 2–3 баллам шкалы определяло показания к замене или дополнению гипотензивной терапии. У пациентов с компенсированным ВГД, получающих комбинированную терапию, высота интрасклеральной полости соответствовала 4–5 баллам классификации.

Закономерные аналогичные показатели характеризовали высоту фильтрационной подушки: при компенсированном ВГД ее высота значительно превосходила соответствующий показатель каждой из подгрупп рефрактерного течения ПОУГ (2-й группы), достигая среднего значения контрольной группы при использовании комбинированной терапии; она оценивалась в 5 баллов. При этом монотерапия демонстрировала невысокие показатели лечения в обеих группах (1–2 балла): высота фильтрационной подушки в 1-й группе, по сравнению с контрольной, была меньшей при применении аналогов простагландинов в 1,4 раза, β -блокаторов – в 1,75 раза. Во 2-й группе с рефрактерным течением ПОУГ высота подушки была снижена по сравнению с контролем в несколько раз.

Толщину конъюнктивального и склерального лоскутов измеряли, принимая во внимание различную гидрофобность основного вещества соединительной ткани глаза в зоне оперативного вмешательства, а также вариабельность пролиферативного потенциала ее клеточных элементов (Zimmerman T. J. et al., 2009; Kerr N. M. et al., 2013). Толщина конъюнктивального лоскута у пациентов контрольной группы составила $(0,80 \pm 0,05)$ мм, что достоверно превышало соответствующий показатель во всех подгруппах обеих групп за исключением пациентов 1-й группы, использующих сочетанную терапию β -блокаторами и ингибиторами

карбоангидразы (рисунок 1), средний показатель которых в 2 и более раз превышал таковой в других подгруппах. При этом толщина конъюнктивального лоскута у пациентов с компенсированным ВГД (1-я группа) всегда достоверно превосходила показатели рефрактерного течения ПОУГ (2-я группа).

Показатели толщины конъюнктивального и склерального лоскутов у пациентов с рефрактерным течением ПОУГ могут служить лишь косвенными маркерами повышенного ВГД, однако редукция толщины конъюнктивы в зоне оперативного вмешательства прямо коррелирует с уплотнением соединительной ткани, наблюдаемым в лоскутах, и отсутствием в ней диффузии ВГЖ, т. е. снижением высоты фильтрационной подушки.

Толщина склеры у пациентов с компенсированным ВГД (1-я группа) достоверно не отличалась от контрольного значения; при этом у пациентов 2-й группы во всех подгруппах она была меньшей, чем в 1-й и 3-й группах. По-видимому, этот параметр является достаточно стабильным при ПОУГ, не отражает характера структурных изменений и, следовательно, не может служить информативным УБМ-маркером.

В целом, в УБМ-исследовании вновь созданных путей оттока ВГЖ наиболее существенные результаты, по сравнению с монотерапией, получены при сочетании β -блокаторов с простагландинами или с ингибиторами карбоангидразы, а также в ряде случаев трехкомпонентной терапии. Важно отметить, что применение фиксированных комбинаций гипотензивных антиглаукомных препаратов способствовало и некоторому снижению ВГД у пациентов с рефрактерным течением ПОУГ.

Иммуногистохимическое исследование склеральных лоскутов. В склере пациентов с ПОУГ CD34 экспрессировали эндотелиальные клетки и перициты коллекторных канальцев, сочетаясь с расширением их просветов. В наибольшем количестве CD34-позитивные эндотелиоциты выявлены в склере впервые оперированных пациентов, не применяющих препараты местной терапии, независимо от возраста пациентов и стадии глаукомы. В несколько меньшем количестве продукты иммуногистохимической реакции содержались в препаратах пациентов с монотерапией аналогами простагландинов; в остальных случаях реакция была крайне слабой.

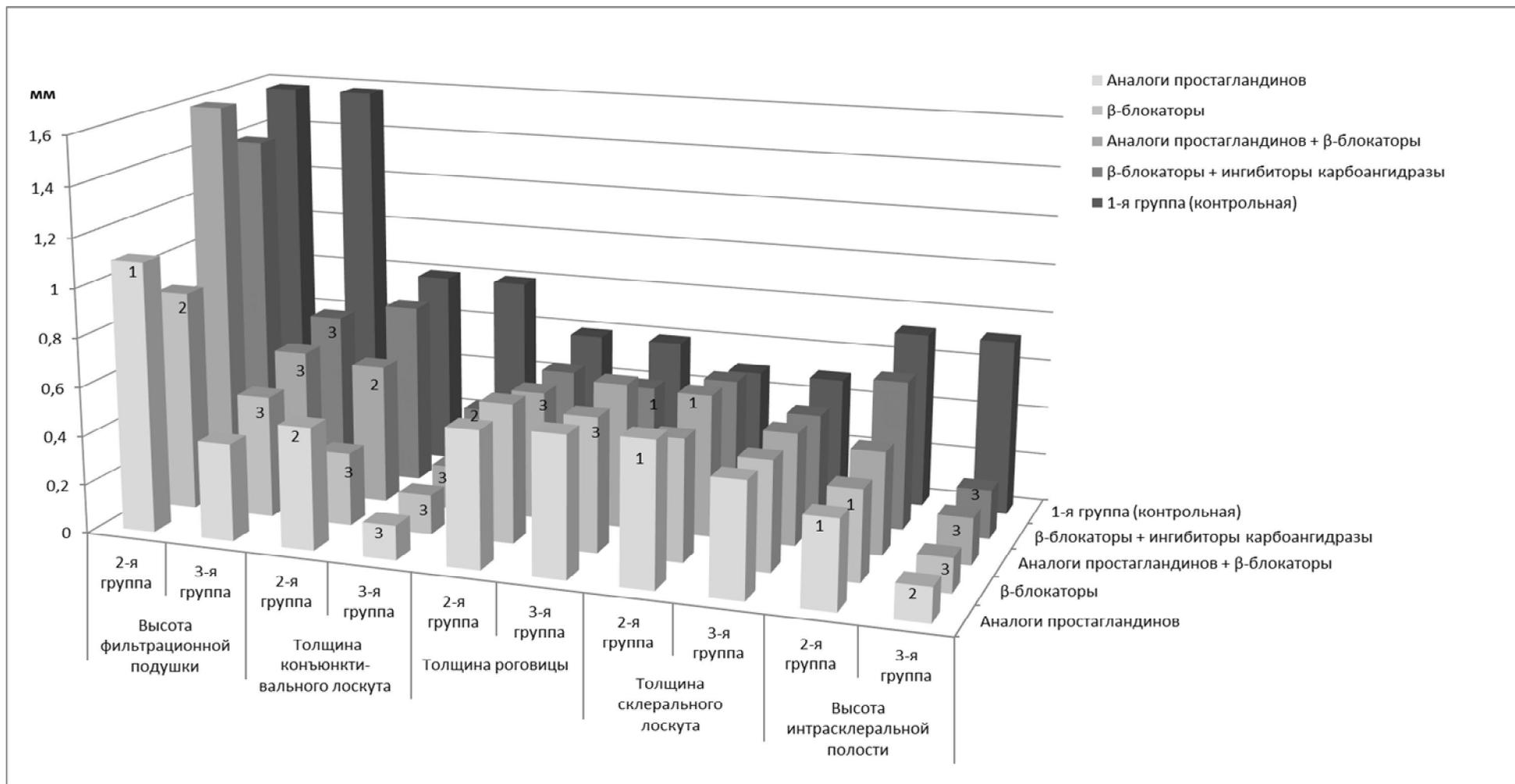


Рисунок 1 – Сравнительный анализ средних параметров послеоперационной ультразвуковой биомикроскопии у пациентов с компенсированным (2-я группа) и декомпенсированным (3-я группа) ВГД, использующих местные гипотензивные препараты или их сочетания. При сравнении с контрольными показателями:

1 – $p \leq 0,05$, 2 – $p \leq 0,01$, 3 – $p \leq 0,001$.

При рефрактерном течении ПОУГ уровень экспрессии CD34 был неравномерным, и относительно большее количество меченых эндотелиоцитов содержалось в образцах пациентов, применяющих β -блокаторы в сочетании с ингибиторами карбоангидразы. С учетом данных УБМ, визуализирующих рыхлую и высокую фильтрационную подушку, можно предположить позитивную роль в ее функционировании экспрессирующих CD34 клеточных элементов.

Экспрессия фибронектина в склере пациентов с ПОУГ имела внеклеточный характер, приурочена к водяным венам и повышена при увеличении числа матрикс-продуцирующих клеток и при преобладании в этой популяции биосинтетически активных форм – фибробластов. Наиболее выраженная экспрессия фибронектина отмечена у впервые оперированных пациентов без медикаментозного лечения, менее значимая – при монотерапии аналогами простагландинов (рисунок 2). При рефрактерном течении ПОУГ экспрессия фибронектина более значительна при монотерапии (схемы 1 и 2), наименьшая – при применении β -блокаторов с ингибиторами карбоангидразы или с аналогами простагландинов (схемы 4 и 5) (см. таблицу).

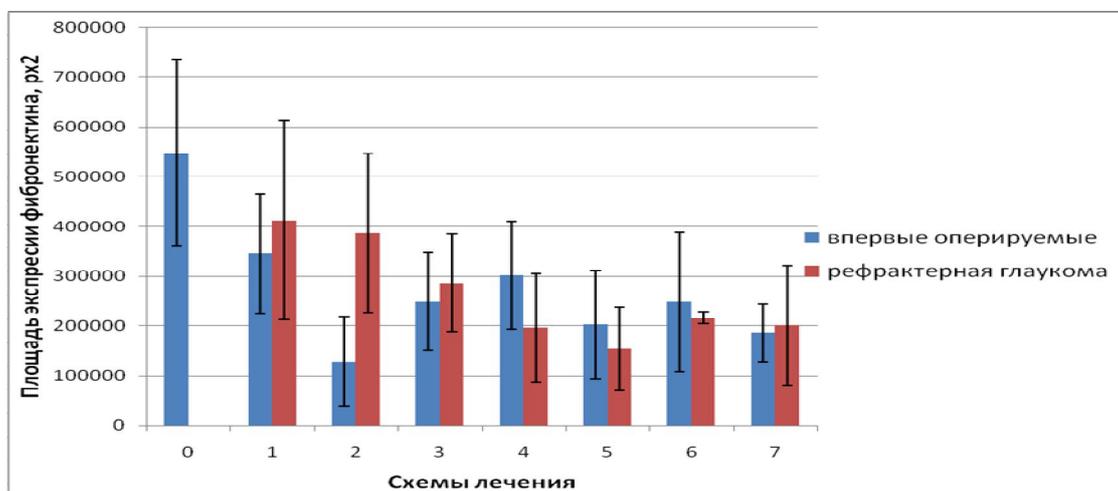


Рисунок 2 – Экспрессия фибронектина в склеральных лоскутах пациентов по данным автоматического анализа изображения ($p > 0,5$).

Схемы лечения – в таблице.

Ретроспективный статистический анализ эффективности местной гипотензивной терапии. Общее количество – 1 197 глаз 650 пациентов (см. таблицу) – разделены на 4 группы репрезентативного возраста по

принципу компенсации ВГД, а также повторности операции: 527 глаз с декомпенсированным ВГД перед первичной операцией; 467 – неоперированные с компенсированным ВГД в условиях местной терапии; 81 – добавлены к предыдущей группе – оперированные с компенсированным ВГД; наконец, 122 глаза с рефрактерным течением ПОУГ.

Анализ 527 глаз с декомпенсированным ВГД перед первичной антиглаукомной операцией. Изучение эффективности консервативной терапии начинали с изучения распределения значений ВГД по стадиям глаукомы: как и ожидалось, оно возрастало с увеличением стадии ($p = 0,000008$). Распределение ВГД в зависимости от консервативной терапии: 1–8 – схемы лечения, 0 – консервативное лечение не проводилось у 21 пациента. При анализе без учета стадий ПОУГ схемы 2, 4 и 5 обладали гипотензивным эффектом ($p = 0,0011$) (рисунок 3).

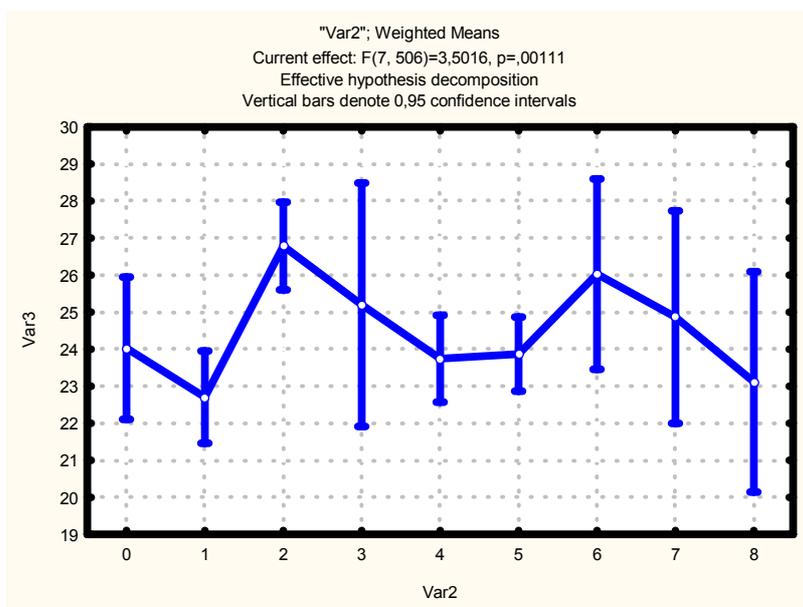


Рисунок 3 – Распределение значений ВГД в зависимости от схемы местной гипотензивной терапии перед первой антиглаукомной операцией, декомпенсированное ВГД, 95% доверительный интервал.

Схемы лечения – в таблице.

Далее изучали гипотензивный эффект на различных стадиях ПОУГ: у пациентов с I и II стадиями ни одна из схем не привела к статистически более частому достижению толерантного ВГД и ниже ($p > 0,5$). На III стадии выявлен статистически значимый гипотензивный эффект β -блокаторов (схема 2) ($p < 0,0001$), хотя целевое ВГД не достигнуто. Гипотензивный эффект показан и в IV стадии ПОУГ (схемы 2, 5 и 6 – до 24 мм рт. ст. и ниже; схема 3 – до уровня

21 мм и ниже ($p < 0,01$), что облегчало болевой синдром.

Анализ 467 неоперированных глаз с компенсируемым ВГД в условиях местной терапии (из них 35 без лечения) показал отсутствие значимого влияния каждой из схем лечения на поддержание ВГД в пределах целевых значений без учета стадии глаукомы ($p = 0,45$). При попарном статистическом анализе у пациентов с I, II и III стадиями ни одна из схем не привела к достижению целевого ВГД ($p > 0,5$). На IV стадии выявлен гипотензивный эффект препаратов схем 2, 5 и 6 со снижением ВГД до уровня 20–23 мм рт. ст. ($p < 0,0001$) с купированием болевого синдрома.

Изучение глаз с компенсируемым ВГД (467 неоперированных глаз и 81 – оперированных) проведено с целью более глубокого анализа положительного эффекта в снижении ВГД схем местной терапии несмотря на то, что проанализированы глаза с условно нормальной анатомией дренажной системы и искусственно созданными путями оттока ВГЖ. Анализ 548 глаз (из них 36 без лечения) показал, что с увеличением стадии ПОУГ среднее ВГД, как и в других группах, закономерно возрастало несмотря на его компенсированный уровень ($p = 0,000008$). Не обнаружено значимого влияния схем лечения на поддержание ВГД в пределах целевых значений при рассмотрении без учета стадии ПОУГ ($p = 0,37$). У пациентов с I, II и III стадиями ПОУГ с толерантным ВГД (рисунок 4) ни одна из схем не привела к достижению целевого ВГД ($p > 0,5$); на IV стадии – аналогично предыдущей группе.

Анализ эффективности местной медикаментозной терапии при рефрактерном течении ПОУГ (122 глаза). С увеличением стадии ПОУГ, как и следовало ожидать, выявлено закономерное возрастание средних показателей ВГД ($p = 0,001$); мультифакторный анализ не проводили в связи с недостаточностью выборки.

Таким образом, по данным гистологического изучения склеральных лоскутов и ультразвуковой визуализации послеоперационных дренажных путей, исследованы структурные основы фиброзирования фильтрационных подушек при рефрактерном течении ПОУГ в условиях применения местных гипотензивных препаратов различных групп, и продемонстрированы ультраструктурные и иммуногистохимические маркеры ремоделирования соединительной ткани.

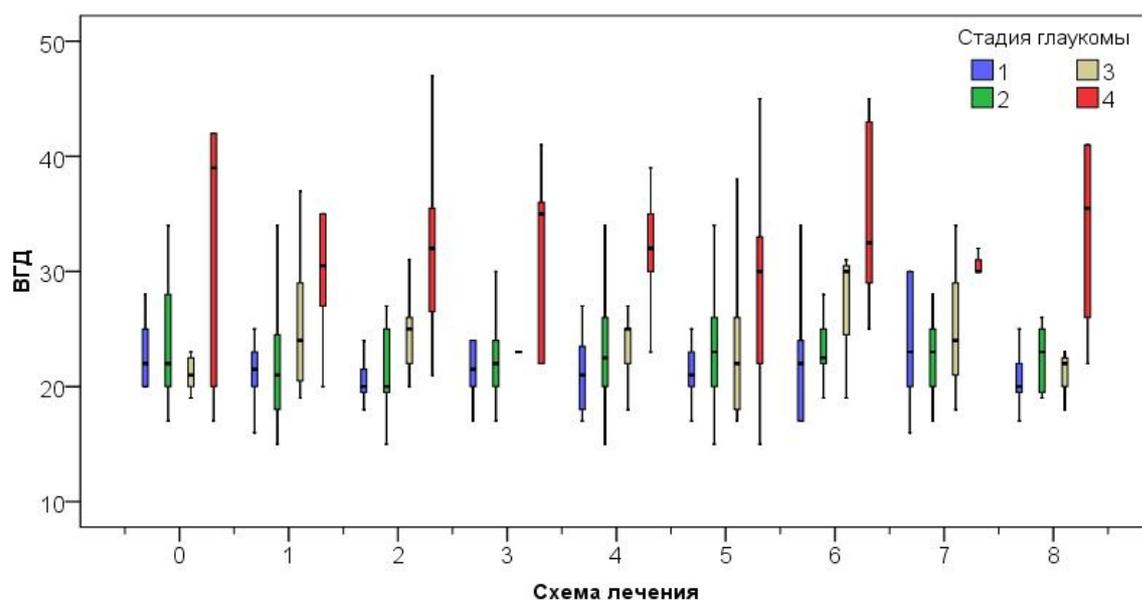


Рисунок 4 – Распределение показателей ВГД в неоперированных (467) и оперированных (81) глазах в зависимости от стадии глаукомы и схемы лечения (компенсация ВГД), 95% доверительный интервал. На III стадии ПОУГ при применении схемы 3 – 1 наблюдение. Схемы лечения – в таблице.

Клинико-морфологические маркеры повышенного риска рефрактерности глаукомы при глубокой склерэктомии включают в себя постоперационное формирование эхоплотных стенок интрасклеральной полости или ее редукцию, что сочетается с увеличением численной плотности матрикс-продуцирующих клеток и высокой экспрессией фибронектина в экстрацеллюлярном матриксе склеры, особенно при отсутствии местной гипотензивной терапии или применении аналогов простагландинов.

При этом клинико-морфологические маркеры благоприятного прогноза антиглаукомной операции основаны на постоперационном формировании гипозоженных высоких фильтрационных подушек, высокой экспрессии CD34 эндотелиоцитами коллекторных канальцев склеры, а также сниженной плотностью волокон и основного вещества соединительной ткани, наиболее выраженных при использовании β -блокаторов в сочетании с ингибиторами карбоангидразы.

ВЫВОДЫ

1. Ультроструктурная организация эндотелиальных клеток коллекторных канальцев в склеральных лоскутах впервые и повторно оперированных пациентов отражала баланс цитодеструкции и клеточной регенерации и не зависела от применяемой до антиглаукомной операции схемы местной гипотензивной терапии.

2. Биосинтетически активные матрикс-продуцирующие клетки склеры у впервые оперированных пациентов локализовались преимущественно вблизи элементов дренажной системы глаза. Волокна и основное вещество соединительной ткани при функционировании фильтрационных подушек характеризовались низкой электронной плотностью. При рефрактерном течении первичной открытоугольной глаукомы плоские фильтрационные подушки с редуцированной интрасклеральной полостью сочетались с более выраженной пролиферативной реакцией фибробластов, формирующих перивенулярные клеточные инфильтраты и гранулемы вдоль краев резекции.

3. При иммуногистохимическом изучении склеральных лоскутов наибольшая экспрессия биомаркера CD34 в эндотелиальных клетках коллекторных канальцев сочеталась с расширением их просветов и имела место при отсутствии медикаментозного лечения. При рефрактерном течении глаукомы относительно большее количество CD34-позитивных клеток выявлено при применении β -блокаторов в сочетании с ингибиторами карбоангидразы и сочеталось с гипохрогенной и высокой фильтрационной подушкой.

4. Экстрацеллюлярная экспрессия фибронектина в образцах склеры повышена при увеличении числа матрикс-продуцирующих клеток, особенно при преобладании фибробластов. По данным системы автоматического анализа изображения, при рефрактерном течении глаукомы выявлена тенденция повышенной экспрессии фибронектина в образцах склеры при монотерапии аналогами простагландинов или β -блокаторами и сниженная – при применении β -блокаторов с ингибиторами карбоангидразы или с аналогами простагландинов.

5. Ультразвуковая биомикроскопия зоны оперативного вмешательства у пациентов с рефрактерным течением глаукомы, по сравнению с наблюдениями

с компенсируемым офтальмотонусом, продемонстрировала достоверно ($p \leq 0,01$) более низкие показатели высоты фильтрационной подушки и интрасклеральной полости; при стабильном течении глаукомы толерантный офтальмотонус отмечен при использовании β -блокаторов в сочетании с ингибиторами карбоангидразы.

6. Ретроспективный статистический анализ 1197 глаз пациентов с первичной открытоугольной глаукомой, в том числе с рефрактерным течением, не выявил достоверного влияния местной гипотензивной терапии на достижение целевого ВГД при рассмотрении с учетом и без учета стадии глаукомы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразно гистологически изучать склеральные лоскуты, резецированные в ходе антиглаукомных операций, что позволяет прогнозировать послеоперационное течение глаукомного процесса.

2. При назначении местной гипотензивной терапии пациентам с рефрактерным течением ПОУГ необходимо учитывать не только уровень ВГД, но и состояние послеоперационных путей оттока ВГЖ методом УБМ с акцентом на морфологии интрасклеральной полости и фильтрационной подушки.

3. В отдаленном послеоперационном периоде при декомпенсации уровня ВГД после 2-х и более антиглаукомных операций необходимо назначать пациентам комбинированные гипотензивные препараты, не содержащие аналоги простагландинов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Исследование структур переднего отрезка глаза при применении антиглаукомных препаратов по данным ультразвуковой биомикроскопии / **А. Е. Нурланбаева**, А. Ж. Фурсова, А. А. Гусаревич, О. Г. Фенькова, О. Г. Гусаревич, С. В. Айдагулова // **Бюллетень Сибирского отделения РАМН. – 2014. – № 6. – С. 88–92.**

2. Роль изменения артериального орбитального кровотока в развитии оптической нейроретинопатии у детей с первичной врожденной глаукомой / О. Г. Фенькова, А. Ж. Фурсова, **А. Е. Нурланбаева**, О. Г. Гусаревич // **Бюллетень Сибирского отделения РАМН. – 2014. – № 6. – С. 93–96.**

3. Гусаревич, О. Г. Изучение связи гипотензивной терапии и процесса рубцевания фильтрационных подушек у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой / О. Г. Гусаревич, А. А. Гусаревич, **А. Е. Нурланбаева** // **Медицина и образование в Сибири (электронный журнал)**. – 2013. – № 6. – Режим доступа: http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1172.

4. Экспрессия CD-34 и фибронектина в склеральных лоскутах пациентов с рефрактерным течением первичной открытоугольной глаукомы / С. В. Айдагулова, **А. Е. Нурланбаева**, А. А. Гусаревич, А. Ж. Фурсова, О. Г. Гусаревич // **Фундаментальные исследования**. – 2014. – № 10, часть 9. – С. 1675–1679.

5. Медикаментозная терапия рефрактерной глаукомы: настоящее и будущее / О. Г. Гусаревич, А. А. Гусаревич, **А. Е. Нурланбаева**, С. В. Айдагулова // РМЖ. Клиническая офтальмология. – 2014. – № 2. – С. 64–68.

6. Сравнительный анализ времени разрыва слезной пленки у студентов НГМУ с синдромом «сухого глаза» после применения различных групп увлажняющих препаратов / Т. Ю. Ким, М. А. Талалаев, С. И. Пушкарь, **А. Е. Нурланбаева** // **Новости глаукомы**. – 2014. – № 3. – С. 10–11.

7. **Нурланбаева, А. Е.** Ретроспективный анализ рубцевания фильтрационной подушки при медикаментозном лечении пациентов с первичной открытоугольной глаукомой / **А. Е. Нурланбаева**, С. И. Пушкарь // **Авиценна-2014 : материалы 5-й Рос. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых**. – Новосибирск, 2014. – Т. 2. – С. 53–54.

8. **Нурланбаева, А. Е.** Ультразвуковая биомикроскопия угла передней камеры глаза при рефрактерной глаукоме в условиях применения гипотензивных средств / **А. Е. Нурланбаева**, С. И. Пушкарь // **Авиценна-2014 : материалы 5-й Рос. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых**. – Новосибирск, 2014. – Т. 2. – С. 54–55.

9. Биомикроскопическая оценка зоны оперативного вмешательства при рефрактерном течении первичной открытоугольной глаукомы / **А. Е. Нурланбаева**, О. Г. Фенькова, А. А. Гусаревич, А. Ж. Фурсова, О. Г. Гусаревич // **Современные технологии диагностики и лечения заболеваний органа зрения : материалы науч.-практ. конф.** – Томск, 2014. – С. 57–62.